

ATIK FETUSLARDAN İZOLE EDİLEN BRUCELLA SUŞLARININ  
KO-AGLÜTİNASYON TESTİ İLE İDENTİFİKASYONLARI

Nejat Aydın<sup>1</sup>, Mustafa Arda<sup>1</sup>, Ömer Akay<sup>1</sup>, Müjgan İzgür<sup>2</sup>  
Hatice Ayhan<sup>3</sup>, Ömer Esenalı<sup>4</sup>, Fuat Aydın<sup>5</sup>

Identification of Brucella strains isolated from aborted fetuses with  
Co-agglutination Test

**Summary:** *The aim of this study was to identify 50 Brucella strains isolated from aborted fetuses with co-agglutination test in addition to conventional identification procedures.*

*Brucella strains were subjected to tolerance tests against basic fuchsin and thionin and their H<sub>2</sub>S production abilities were tested. Additionally, susceptibilities of these isolates to Tbilisi and Weybridge phages were determined. Co-agglutination reagents were prepared from anti-A and anti-M sera obtained from Weybridge, UK and the antigenic properties of these 50 isolates were evaluated with these reagents. Meanwhile, the reagents were simultaneously tested with standart Brucella strains (Br. abortus S 19 and Br. melitensis 16 M).*

*Of the Brucella isolates, 86 % were found to be susceptible to both Tbilisi and Weybridge phages. Similarly, 86 % of these isolates grew on media containing thionin and basic fuchsin with the final concentration of 1 / 50000 though the same strains failed to grow on media containing thionin with a final concentration of 1 / 25000. Since these strains were found to be positive with the co-agglutination reagent prepared against*

1 Prof. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

2 Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

3 Uzm. Bio., A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

4 Araş. Gör., A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

5 Araş. Gör., Atatürk Üniversitesi Kars Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim

Dalı, Kars.

*A-antiserum, 43 strains (86 %) were identified as Br. abortus, while 7 strains (14 %) were identified as Br. melitensis.*

**Özet:** *Bu çalışmada, hayvanların atık fetuslarından izole edilen 50 Brucella suşunun bilinen teşhis yöntemleri yanısıra, ko-aglütinasyon testi ile de identifikasyonları amaçlanmıştır.*

*Brucella etkenlerinin bazik fuksin ve thionine tolerans testleri, H<sub>2</sub>S oluşturmaları incelenmiş, ayrıca Tbilisi ve Weybridge fajlarına karşı duyarlılıkları da araştırılmıştır. Weybridge, İngiltere'den sağlanan anti-A ve anti-M monospesifik serumları ile laboratuvarında ko-aglütinasyon reagent'leri hazırlanarak ve bunlarla izole edilen Brucella suşlarının anti-jenik özellikleri incelenmiştir. Ayrıca, hazırlanan reagent'ler standart suşlarla (Br. abortus S 19 ve Br. melitensis 16 M) da kontrol edilmiştir.*

*Brucella suşlarının % 86'sı Tbilisi ve Weybridge fajlarına karşı duyarlı bulunmuş, benzer şekilde % 86'sının 1 / 50000 thonin, 1 / 50000 bazik fuksinde üredikleri, ancak 1 / 25000 thioninde üremedikleri saptanmıştır. Bu suşların A anti-serumu ile hazırlanan ko-aglütinasyon reagent'i ile de pozitif olması nedeniyle 43 suş (% 86) Br. abortus, aynı testlerle değerlendirilen 7 suş (% 14) ise Br. melitensis olarak tanımlanmıştır.*

### Giriş

Brucella grubu etkenler tarafından oluşturulan Brucellosis, hayvanlarda subakut veya kronik seyreden, insanlarda ise romatizma benzeri semptomlarla karakterize bir enfeksiyondur.

Fakültatif anaerobik Gram negatif çomak ve koklar grubunun Brucella cinsinde yer alan (26) mikroorganizmalardan insan ve hayvanlar için en önemlileri *Br. abortus* ve *Br. melitensis* olup; bu iki etken inek ve koyunlarda atıklara, metritislere, mastitislere, artritislere, erkek hayvanlarda ise orşitislere neden olmaktadır (3, 6, 8). Gram negatif, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz ve kokoid çomak tarzında olan bu mikroorganizmalar, katı besi yerlerinde -S karakterli koloni oluşturmakta, buyyonda ise hafif bulanık tarzda bir üreme göstermektedirler (3, 6). İlk izolasyonlarda, bazıları % 10 CO<sub>2</sub>'e ihtiyaç gösteren bu etkenlerin optimal üreme ısısı 37 °C olup, optimal üreme süresi ise 5-7 gündür. Bu mikroorganizmaların identifikasyonlarında CO<sub>2</sub> ihtiyaçları, H<sub>2</sub>S oluşturmaları incelenmekte, çeşitli boyalara karşı tolerans (17, 28, 37, 38) ve çeşitli fajlara karşı (Tbilisi, Weybridge, Berkeley, anti-R)

duyarlılık testleri (13, 15, 16, 29, 36) kullanılmaktadır. Ayrıca, etkenlerin M ve A antijenlerini değişik oranlarda bulundurmaları göz önüne alınarak, bu antijenlere karşı hazırlanmış monospesifik serumlarla da identifikasyon mümkün olmaktadır (23, 32, 40).

Brucellosis'in teşhisi; etken izolasyon ve identifikasyonuna yönelik direkt şekilde yapıldığı gibi, enfekte hayvanların kan, kan serumları, süt ve süt serumlarına uygulanan serolojik testlerle indirekt olarak da yapılabilmektedir. Serolojik testlerden plate aglütinasyon (34, 39), seroaglütinasyon (19, 35), komplement fikzasyon testi (10, 14), indirekt flouresans antikor tekniği (18, 36), radio immuno assay (9, 21), ELISA (22, 27) ile Coombs (5, 7), merkapttoethanol (30, 31), rivanol (31, 33) aglütinasyon testleri en çok kullanılanlarıdır. Joseph ve Yee (23) ineklerden izole ettikleri 168 *Br. abortus* suşundan -S formu gösteren 130 suşun biyotiplendirmesini yapmışlar, bunlardan % 86.9'unu tip 2, % 10'unu tip 1, % 2.3 ünü tip 9 ve % 0.8'ini biyotip 6 olarak tanımlamışlardır. Araştırmacılar, 130 suştan 127'sinin A ve 3 suşun ise M monospesifik serumları ile reaksiyon verdiklerini de açıklamışlardır. Verger ve ark. (40), sığırlardan izole ettikleri 182 *Br. abortus* suşundan 181'inin biyotip 3 ve 1 suşun biyotip 1 olarak bulunduğunu ve tüm suşların A antiserumu ile pozitif reaksiyon verdiklerini açıklamışlardır. Verger ve ark. (37), sığırlardan 1693 ve koyunlardan izole ettikleri 190 Brucella suşunun biyotiplendirmelerini yaptıklarında, sığır orijinli 1683 suşu *Br. abortus* ve 10 suşu da *Br. melitensis* olarak tanımlamışlar, *Br. abortus* suşlarından 778'inin tip 1, 28'inin tip 2, 293'ünün tip 3, 17'sinin tip 4 ve 67'sinin tip 9 ve 10 *Br. melitensis* suşunu ise biyotip 3 olarak ayırdıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar aynı çalışmada, insan ve çeşitli hayvan türlerinden izole ettikleri toplam 2058 Brucella suşunu M ve A antiserumları ile incelediklerinde; *Br. abortus* suşlarından 85'inin A serumu ile negatif, M monospesifik serumu ile pozitif sonuç verdiklerini ve bunların tip 4 ve tip 9 grubuna, ayrıca 2 suşun hem M ve hem de A antiserumu ile pozitif bulduklarını, *Br. melitensis* suşlarından 130'unun A ve M serumları, 45'inin A ve 45 suşun ise M antiserumu ile pozitif bulunduğunu, M ve A ile pozitif sonuç veren suşların tip 3 ve M antiserumu ile pozitif bulunan 45 suşun tip 2 ve A antiserumu ile pozitif sonuç veren 45 suşun tip 1'e dahil olduklarını açıklamışlardır.

Brucella türlerinin kesin identifikasyonu için faj testinden yararlanılmaktadır. Rutin amaçla en çok kullanılanları Tbilisi (12, 40), Weybridge (12, 37), Berkeley (39) fajlarıdır. Verger ve ark. (37), dene-

melerinde kullandıkları 1683 *Brucella abortus* suşunun Tbilisi ve Berkeley, 190 *Br. melitensis* suşundan tümünün Berkeley fajı, Verger ve ark. (40), 181 *Br. abortus* suşunun Tbilisi fajı tarafından  $1 \times \text{RTD}$  ve  $10^4 \times \text{RTD}$ 'de lize edildiğini bildirmişlerdir. Verger ve ark. (38), 264 *Br. abortus* suşunun Tbilisi, Weybridge ve Izatnagar fajı tarafından lize olduklarını açıklamışlardır.

Ko-aglütinasyon testi antijenik özelliklerine göre mikroorganizmaların serolojik olarak gruplandırılmasında oldukça önem taşımakta ve bu test ile bir çok mikroorganizmanın serogruplandırılması ve identifikasyonu yapılabilmektedir (1, 11, 20, 24). *Brucella* etkenlerinin identifikasyonunda ko-aglütinasyon testinin kullanılmasına ilişkin yapılan çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Batra ve ark. (4)'nın yaptıkları çalışmada, sığırların atık fetuslarına ait 21 adet mide içeriği incelenmiş, 16'sından *Brucella* mikroorganizmaları izole edilirken 20 mide içeriğinin *Brucella* yönünden ko-aglütinasyon testinde pozitif olduğu saptanmıştır. Ayrıca, araştırmacılar bu hayvanların atıktan 20 gün sonra kan serumlarını sero-aglütinasyon testi ile incelediklerinde tümünü pozitif bulduklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, hayvanların atık fetuslarından izole edilen 50 *Brucella* suşunun,  $\text{CO}_2$  gereksinimi,  $\text{H}_2\text{S}$  üretimi, boya tolerans ve faj duyarlılık testlerinin yanısıra, laboratuvarında hazırlanan ko-aglütinasyon reagent'leri ile identifikasyonları amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

### Standart Suşlar

*Staph. aureus* Cowan I: Ko-aglütinasyon reagent'lerinin hazırlanmasında kullanılan bu suş, A.Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji Bilim Dalı kültür koleksiyonundan sağlanmıştır.

*Br. abortus* S 19 ve *Br. melitensis* 16 M: Laboratuvarında hazırlanan ko-aglütinasyon M ve A reagent'lerinin pozitif kontrolü olarak kullanılan bu suşlar Alfort Veteriner Okulu, Fransa'dan sağlanmıştır.

### Test Suşları

Denemede Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsün'den sağlanan toplam 50 adet *Brucella* suşu kullanılmıştır.

### **Antiserumlar**

Ko-aglütinasyon M ve A reagent'lerinin hazırlanmasında kullanılan monospesifik M ve A serumları Weybridge, İngiltere'den temin edilmiştir.

### **Fajlar**

İzole edilen *Brucella* suşlarının faj tiplendirilmesinde kullanılan faj Tbilisi Alfort Veteriner Okulu, Fransa'dan, Weybridge fajı Weybridge, İngiltere'den sağlanmıştır.

### **Besi Yerleri**

*Brucella* etkenlerinin identifikasyonunda 1 / 25000 ve 1 / 50000 thionin ve bazik fuksin içeren *Brucella* agar, faj denemeleri için Trypticase Soy Agar (TSA), Trypticase Soy Broth (TSB) kullanılmıştır.

### **İdentifikasyon çalışmaları**

Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, *Brucella* laboratuvarında inek ve koyunların atık fetuslarından izole edilen 50 adet *Brucella* etkeninin çalışmada tür düzeyinde identifikasyonları yapılmıştır. Bu amaçla suşların CO<sub>2</sub> gereksinimi, H<sub>2</sub>S oluşturması, 1 / 25000 ve 1 / 50000 thionin ve bazik fuksinli besi yerlerinde üreme, M ve A monospesifik serumları ile aglütinasyon, Tbilisi ve Weybridge fajlarına duyarlılık testlerinden yararlanılmıştır.

### **Ko-aglütinasyon testi**

*Ko-aglütinasyon reagentlerinin hazırlanması:* Ko-aglütinasyon reagent'leri Batra ve ark. (4)'nın bildirdikleri yöntemle hazırlanmıştır. Bunun için TSB'de üretilen *Staph. aureus* Cowan 1 suşu 3500 rpm'de 30 dak santrifüj edildikten sonra 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra PBS ile % 5 sulandırılarak, % 2 formol ilave edilmiş ve 1 gece + 4 °C'de tutulmuştur. Tekrar iki kez yıkanarak PBS'de % 5 olarak sulandırılan karışım 80 °C lik su banyosunda 5 dak inkube edildikten sonra iki eşit bölüme ayrılmıştır. Her ml'ye 0.1 ml M ve A antiserumlarından ayrı ayrı ilave edilmiş, arasıra çalkalanmak suretiyle 37 °C de iki saat tutulmuş, üç kez PBS ile yıkanmış, final konsantrasyonları % 5 olacak şekilde sulandırılmış ve testte kullanılmışlardır. Testte negatif kontrol

olarak kullanılan reagent de aynı yönteme göre normal serum ile hazırlanmıştır.

*Ko-aglütinasyon testinin uygulanması:* Brucella agarda üretilen test suşlarının kolonilerinden koyu bir süspansiyon hazırlanarak, bu süspansiyonun 50 µl'si ko-aglütinasyon reagent'lerinin aynı miktarı ile ayrı ayrı karıştırılmış ve sonuçlar iki dakika içinde değerlendirilmiştir. Aynı işlemler çalışmada kullanılan standart *Brucella abortus* S 19, *Brucella melitensis* 16 M suşları ile normal ko-aglütinasyon reagent'i de kullanılarak karşılaştırmalı olarak yapılmıştır.

### Bulgular

*İdentifikasyon sonuçları:* Denemede kullanılan 50 Brucella suşu bilinen yöntemlere göre incelenmiş ve suşların 43'ü *Brucella abortus*, 7'si ise *Brucella melitensis* olarak identifiye edilmiştir (Tablo 1).

*Br. abortus* suşlarının çeşitli özellikleri göz önünde tutularak tümü biyotip 3'e, 7 *Br. melitensis* suşunun ise biyotip 1'e dahil oldukları ortaya konulmuştur.

*Ko-aglütinasyon test sonuçları:* 43 *Br. abortus* suşunun monospesifik A serumu ile hazırlanan ko-aglütinasyon reagent'i ile lam üzerinde kuvvetli, 7 *Br. melitensis* suşunun monospesifik M serumu ile 4+ lık bir reaksiyon verdikleri, buna karşın *Br. abortus* suşlarının M, *Br. melitensis* suşlarının A antiserumları ile hazırlanan reagent'lerle negatif olduğu, yine normal serumla hazırlanan reagent'in de tüm suşlarla negatif sonuç verdiği belirlenmiştir (Tablo 2). Kontrol olarak kullanılan *Br. abortus* S 19'un A, *Br. melitensis* 16 M suşunun M antiserumları ile pozitif, aynı suşların sırasıyla monospesifik A, monospesifik M ve normal serumla hazırlanan reagent'lerle negatif sonuç verdikleri belirlenmiştir (Tablo 2).

### Tartışma ve Sonuç

Son yıllarda, Brucella türlerinin identifikasyonları bu konuda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ve buna göre hazırlanacak eradikasyon programlarında önem taşımaktadır. Şöyle ki, Brucella türlerini tek bir konakçı hayvan için düşünmek mümkün değildir. Özellikle sığırcı ve koyun yetiştiriciliğinin birlikte yapıldığı bölgelerde *Brucella abortus*'a koyunlarda, *Brucella melitensis*'e de sığırlarda rastlandığı araş-

Tablo 1. Denemede kullanılan brucella suşlarının özellikleri

Etken	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	Thionin		Bazık fuksin		Aglutinasyon		Koaglutinasyon		Fajlar	
			1 / 25000	1 / 50000	1 / 25000	1 / 50000	A	M	A	M	Tb.	Weyb.
Br. abortus (43)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Br. melitensis (7)	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-

Tb.: Tibilisi;

Weyb.: Weybridge

Tablo 2. Ko-aglutinasyon reagent'lerinin saha ve standart suşlarla karşılaştırılması.

Ko-aglutinasyon reagent'i	Br. abortus 19 S	Br. melitensis 16 M	Sahadan izole 43 Br. abortus suşu	Sahadan izole 7 Br. melitensis suşu
Monospesifik M	—	+ - + +	—	+ + + +
Monospesifik A	+ + + +	—	+ + + +	—
Normal Serum	—	—	—	—

tırcılar tarafından bildirilmiştir (17, 25, 38). Feinhaken ve Dafni (17), İsrail'de yaptıkları bir çalışmada sığırlardan % 30-40'a kadar varabilen oranlarda *Brucella melitensis* izole ettiklerini, ve yine Kaitmazova ve Ostrovskaja (25), Sovyetler Birliğinde de buna benzer sonuçlar aldıklarını açıklamışlardır.

*Brucella* türlerinin identifikasyonları; CO<sub>2</sub> ihtiyaçları, H<sub>2</sub>S üretimleri ve boya tolerans testlerine göre yapılabilmektedir (2, 3, 28). Ayrıca, *Brucella* etkenlerini taşıdıkları M ve A antijenlerinin oranlarına göre identifiye etmek mümkünse de, biyotip düzeyinde bu özellikler yeterli olmamaktadır (2, 3, 37). *Br. abortus*'un biyotip 4, 5 ve 9'u A monospesifik serumu, *Br. melitensis*'in biyotip 2'si de M monospesifik serumlarıyla negatif sonuç vermekte ve dolayısıyla teşhiste zaman zaman güçlükler ortaya çıkmaktadır. Bunun için kesin identifikasyonda faj duyarlılık testlerinden yararlanılmaktadır. *Brucella abortus*'un bütün biyotipleri Tbilisi ve Weybridge fajları tarafından lize oldukları halde, *Br. melitensis* biyotipleri bu fajlar tarafından lize edilememektedir (12, 39). Çalışmada, 50 *Brucella* suşunun CO<sub>2</sub> gereksinimi, H<sub>2</sub>S üretimi ve boyalara tolerans durumları araştırılmış, M ve A antiserumlarıyla aglutinasyon ve de Weybridge ve Tbilisi fajları ile duyarlılık testleri yapılmış, bu suşlardan 43'nün *Brucella abortus* biyotip 3, 7'sinin ise *Brucella melitensis* biyotip 1'e dahil oldukları saptanmıştır.

Son yıllarda bir çok hastalığın teşhisinde ko-aglutinasyon testinden başarıyla yararlanılmaktadır. Özellikle oto aglutinasyon, spontan aglutinasyon veren ya da -R formları gösteren mikroorganizmaların bu yöntemle kolaylıkla teşhisleri yapılabilmektedir (1, 20). *Brucellosis*'in direkt teşhisinde son yıllarda ko-aglutinasyondan da yararlanılabileceği bildirilmektedir (4). Batra ve ark. (4), *Brucellosis*'in çabuk teşhisi amacı ile mide içeriğiyle yaptıkları ko-aglutinasyon testini diğer teşhis yöntemleriyle karşılaştırdıklarında bu yöntemin oldukça uygun sonuç verdiğini açıklamışlardır. *Brucella* M veya A monospesifik serumları ile



Brucella kültürleri lam üzerinde aglütinasyona tabi tutulabilir. Ancak monospesifik serumların hazırlanmasının güç olması ve her işlemde büyük miktarlarda serum gerektirmesi nedeniyle az sayıda örneğin incelenmesi gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır. Aynı amaçla kullanılabilen ko-aglütinasyon testinde ise bu monospesifik serumların az miktarları dahi bir çok örneğin işlenmesini sağlamakta ve ayrıca testte indikatör görevi üstlenen Cowan I suşu nedeniyle reaksiyon daha kolay görülebilir hale gelmektedir. Çalışmada, 43 Brucella abortus suşu laboratuvarında hazırlanan ko-aglütinasyon A, 7 Brucella melitensis suşu ise M reagent'leri ile pozitif sonuç vermiş ve monospesifik M ve A antiserumlarıyla yapılan aglütinasyonda olduğu gibi aralarında herhangi bir kros reaksiyona rastlanılamamıştır.

Laboratuvarında hazırlanması basit, sadece çok az miktarlarda monospesifik serumlara ihtiyaç gösteren, dolayısıyla ucuz olarak nitelendirilebilen ko-aglütinasyon testinin mide içeriği veya kültürle yapılmasıyla Brucella etkenlerinin tür düzeyinde identifikasyonu sağlanabilecektir.

#### Kaynaklar

1. Akay, Ö., İzgür, M., Esendal, Ö. ve Çetin, C. (1990). *İnek sütlerinden izole edilen streptokok suşlarının serogruplandırılması*. TBTA, VHAG-760 No. lu proje, Ankara.
2. Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. And Verger, M.J. (1988). *Techniques for the Brucellosis laboratory*. INRA, Paris.
3. Arda, M. Minbay, A. ve Aydın, N. (1982). *Özel Mikrobiyoloji. Bakteriyel İnfeksiyöz Hastalıklar*. A.Ü. Vet. Fak. Yayın. No., 386. A.Ü. Basımevi, Ankara.
4. Batra, H.V., Chand, P., Thillaikoothan, P. and Talwar, G.P. (1987). *Coagglutination test with coloured Staph. aureus from detection of Brucella antigens in cattle Brucellosis*. Vet. Rec., 18: 64-65.
5. Beh, K.J. and Lascelles, A.K. (1973). *The use of the antiglobulin test in the diagnosis of bovine Brucellosis*. Res. Vet. Sci., 14: 239-244.
6. Blobel, H. und SchlieBer, T. (1982). *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. Band IV. Gustaw Fischer Verlag. Stuttgart.
7. Buchmeiser, R. (1961). *Beitrag zur serologischer diagnostik der rinder brucellose mittels der serum-langsammagglutinary der komplement bindings reaktion und des coombs-schnell testes*. Rindertuberl. Brucell., 10: 143-150.
8. Buxton, A. and Fraser G. (1977). *Animal Microbiology*. Vol. 1. Blackwell Scientific Publications Ltd.